

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22688

研究課題名（和文）動物モデルを用いた発作性運動誘発性ジスキネジアの発症機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of onset mechanism of paroxysmal kinesigenic dyskinesia using genetic animal models

研究代表者

八田 大典 (Hatta, Daisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・客員研究員

研究者番号：60886216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：発作性運動誘発性ジスキネジア（PKD）は運動誘発性の不随意運動を特徴とした神経疾患であり、PRRT2の変異により発症する。研究代表者は以前、PKDに関連するPRRT2変異を導入したPrprt2ノックイン（KI）マウスを作製し、本マウスの線条体で神経興奮時に過剰なドーパミン伝達が起こることを見出していた。今回、Prprt2 KIマウスにおいてロータロッド試験により運動能力を評価したところ、薬剤負荷がない場合には野生型との違いがなかったが、L-ドーパ投与時には野生型よりも大きな運動能力低下が生じた。この結果はPKDが線条体のドーパミン伝達異常に起因して発症することを裏付けるものとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでPKDの原因となる神経回路や発症機序は十分に理解されておらず、国外からの報告では主に小脳に着目した解析がなされてきた。しかし本研究では、PKDモデルマウスにおいて線条体での過剰なドーパミン伝達が運動障害に関連することを明らかにし、PKDの発症機序の仮説として「線条体ドーパミン説」という新たな学術的概念を作ることができた。本研究の成果はPKDの治療方法の基盤構築に繋がるだけでなく、痙攣や不随意運動を伴う類似疾患の治療薬開発にも応用可能と考えられ、医療の進歩という形で社会に貢献する研究となった。

研究成果の概要（英文）：Paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) is a neurological disease presenting involuntary movements triggered by sudden movements. We had previously generated Prprt2 knock-in (KI) mice harboring PKD-related Prprt2 mutation, which had much higher extracellular concentration of dopamine than wild-type mice during neuronal stimulation in the striatum. In the present study, we evaluated motor functions of Prprt2 KI mice by rotarod test. Although there was no significant difference in motor functions between wild-type and Prprt2 KI mice, intraperitoneal administration of L-dopa caused more severe motor deficit in Prprt2 KI mice than in wild-type mice. These results suggest that PKD is caused by excessive dopamine transmission in the striatum and subsequent hyper-activity of the cortico-basal ganglia motor loop.

研究分野：神経科学

キーワード：PRRT2 PKD ジスキネジア ドーパミン L-ドーパ ロータロッド

1. 研究開始当初の背景

発作性運動誘発性ジスキネジア (paroxysmal kinesigenic dyskinesia; PKD) は急激な動作等により誘発される不随意運動を特徴とした神経疾患であり、proline-rich transmembrane protein 2 (*PRRT2*) の遺伝子変異により発症するが、原因となる脳領域や神経回路、及び詳しい分子機序は十分に理解されていない。研究代表者は最近、PKDに関連する *PRRT2* 変異を導入した *Prrt2* ノックイン (KI) マウスを作製し、本マウスの脳内で変異型 *Prrt2* が検出されないというデータを得た。これにより PKD が *PRRT2* の *loss-of-function* により発症することが示され、*Prrt2* の生理的機能及びその消失に対して脆弱な脳部位を明らかにすることが PKD の病態解明に直結すると考えられた。国内外の *PRRT2* 研究では解析部位として小脳や大脳皮質、海馬に焦点が当てられてきたが、運動機能やジスキネジアとの関連性を考えれば、黒質-線条体神経路は PKD の責任脳領域の重要な候補と言える。研究代表者はこの脳領域でドーパミン作動性神経細胞に着目して解析を行い、*in vivo* マイクロダイアリシスにより、野生型及び *Prrt2* KI マウスの線条体において細胞外ドーパミン濃度は定常状態では野生型と差が見られないが、興奮刺激を誘発すると野生型よりも約 6.5 倍増加すること (未発表データ、図 1) を見出している。

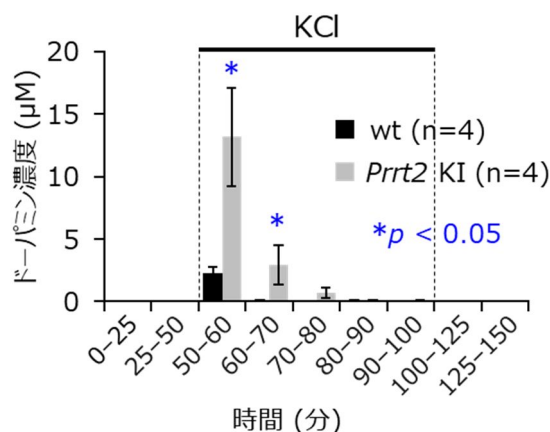


図 1 線条体間質液におけるドーパミン濃度

麻酔下の野生型 (n=4) または *Prrt2* KI マウス (n=4) の線条体においてマイクロダイアリシスを行い、回収液中のドーパミン濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -電気化学検出 (ECD) にて測定した。神経興奮を誘導するために 50 分から 100 分にかけての灌流液中に最終濃度 60 mM の KCl を含有させた。エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$ (wt vs. *Prrt2* KI)

2. 研究の目的

前述のように研究代表者は *Prrt2* KI マウスの線条体において神経興奮時に過剰なドーパミン放出が起こることを見出したが、この現象が PKD の原因であることを示すには、不随意運動を特徴とする PKD 発作との関連付けが必要である。*Prrt2* KI マウスの運動能力に関連する行動解析はこれまで未着手であったため、本研究では最初に PKD 発作を評価するための行動試験系を確立し、続いて線条体のドーパミン作動性神経回路の恒常性の破綻が PKD の発症原因になりうるかに関して、ドーパミンの前駆体である L-ドーパを腹腔内投与することにより検証することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの運動能力の評価にはロータロッド装置 (MK-630B, Muromachi Kikai Co., Ltd.) を用いた。

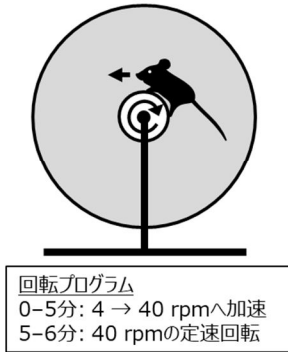
(1) 薬剤非投与下のロータロッド試験

4 週齢及び 8-10 週齢の雄性 C57BL/6J マウスにおいてロータロッド試験を行なった。発育の程度を揃えるために、体重に関して 4 週齢マウスは 10 g 以上、8-10 週齢マウスは 20 g 以上の制限を設けた。ロータロッド試験の訓練として、試験の前日にマウスをロータロッドに乗せ、5 rpm の一定速度で 5 分間回転させた。ロータロッド試験では最初の 5 分間で 4 rpm から 40 rpm へ加速し、その後 40 rpm で 1 分間維持する 6 分間のプログラムを採用し (Tan GH, *et al. Cell Res.* 2017; Takahashi T, *et al. Yonago Acta Med.* 2016)、落下した時点の経過時間を記録した (図 2A)。この試験を 1 匹につき 1 日 3 回行い、その平均値を 1 個体の試験成績とし、4 日間にわたって連日試験を行なった (図 2B)。

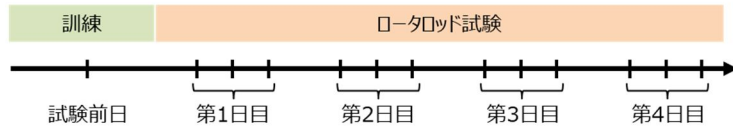
(2) L-ドーパ投与時のロータロッド試験

本試験には4週齢(10g以上)または6週齢(15g以上)、8週齢(20g以上)の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。末梢でのL-ドーパの分解を抑制し中枢移行率を高めるために、L-ドーパの投与前にドーパ脱炭酸酵素阻害剤であるカルビドーパ(一水和物; C2450, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)を25 mg/kgの用量でマウス腹腔内に投与した。その30分後にL-ドーパ(13248, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MA, USA)を50、100または200 mg/kgの用量で腹腔内投与し、その30、60及び90分後にロータロッド試験を行なった(図2C)。ロータロッド試験の回転プログラムは(1)と同様であり、落下した時点の経過時間を記録した。薬液調製として、カルビドーパは5 mg/mLとなるように生理食塩水に懸濁し、L-ドーパは10 mg/mLとなるように0.04 N HClを含む生理食塩水に溶解した。

A ロータロッド試験の概略図



B 未処置マウスの協調運動能力の評価スケジュール



C L-ドーパ投与時の協調運動能力の評価スケジュール

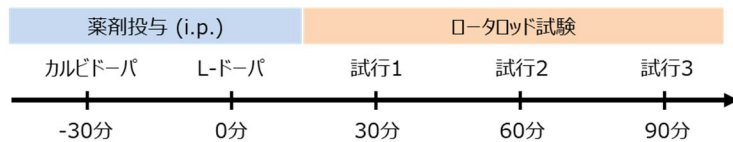


図2 ロータロッド試験の方法とスケジュール

4. 研究成果

PKD発作は運動により誘発される不随意運動を特徴とするため、それを評価するための行動試験として、加速する回転棒の上を強制的に歩行させ、運動障害等により落下するまでの時間を記録するロータロッド試験を採用した。

(1) 未処置マウスでの協調運動の潜在能力

最初に薬剤投与等の負荷を掛けずに野生型及び *Prprt2* KI マウスにおいてロータロッド試験を実施したところ、4週齢(図3A)及び8-10週齢(図3B)のいずれにおいても、野生型と *Prprt2* KI マウスの基礎的な協調運動能力に違いは見られなかった。このことから、未処置マウスにおいては *Prprt2* 変異による運動障害はほとんど生じないと考えられ、この理由としては、*Prprt2* の機能を代償できる分子の発現量や脳内神経ネットワークの安定性等に関する種差が影響していると推定される。

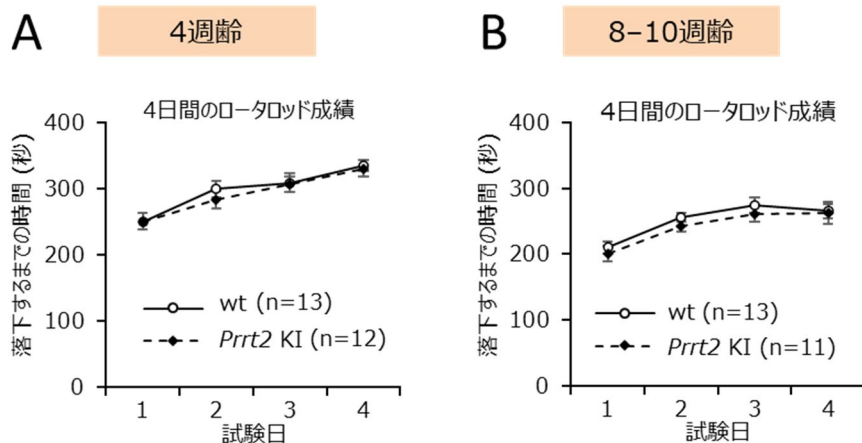


図3 未処置マウスの運動能力

(A) 4週齢の野生型 (n=13) または *Prprt2* KI (n=12) マウスにおいて4日間連日でロータロッド試験を行なった。(B) 8-10週齢の野生型 (n=13) または *Prprt2* KI (n=11) マウスにおいて同様の試験を行なった。エラーバーは標準誤差を示す。

(2) L-ドーパ投与時の協調運動能力

上述のように未処置下では *Prrt2* KI マウスの運動障害が出現しなかったが、発症機序に即した薬剤負荷をかけることで *Prrt2* KI マウスに特異的に運動障害を誘発することができると考えた。研究代表者は最近 *Prrt2* KI マウスの線条体において神経興奮時に過剰なドーパミン伝達が起こることを発見しており（未発表データ、図 1）、これが PKD 発作の原因と仮定すると、脳内ドーパミン量を増加させることが発症機序に即した薬剤負荷になりえる。ドーパミンは血液脳関門を通過しないため、プロドラッグとしてドーパミンの前駆体である L-ドーパを腹腔内投与した。初めに適切な投与量を決めるために、8 週齢の野生型及び *Prrt2* KI マウスに 25 mg/kg カルビドーパとともに 3 段階の用量（50、100 または 200 mg/kg）の L-ドーパを投与しロータロッド試験を実施した（図 4A-C）。その結果、50 mg/kg L-ドーパ投与では野生型と *Prrt2* KI マウスでは運動能力に差が見られなかったのに対し（図 4A）、100 mg/kg L-ドーパでは投与後 60 分（図 4B）、200 mg/kg L-ドーパでは投与後 90 分（図 4C）に *Prrt2* KI マウスで野生型よりも強い運動障害が出現し、このタイミングは 2 つの用量ともに L-ドーパによる運動障害がピークから脱した直後であった。この理由としては、L-ドーパ投与後の運動障害のピーク時には、*Prrt2* KI マウスの運動能力低下が頭打ちになり野生型マウスとの差が見えなくなった可能性や *Prrt2* KI マウスでドーパミンの代謝が遅延している可能性等が考えられる。また、4 週齢マウスに 100 mg/kg L-ドーパ投与した場合にも 8 週齢と同様の結果を得た（図 4D）。また、L-ドーパの溶媒である 0.04 N HCl を含む生理食塩水が運動障害に寄与しないことを確認するために、6 週齢マウスにおいて溶媒投与（図 4E）と 100 mg/kg L-ドーパ投与（図 4F）の比較を行なったところ、溶媒投与では運動障害やジェノタイプ間の運動能力の違いは生じず、L-ドーパ投与時のみ *Prrt2* KI マウスで野生型よりも強い運動障害が現れ、溶媒の影響は否定された。

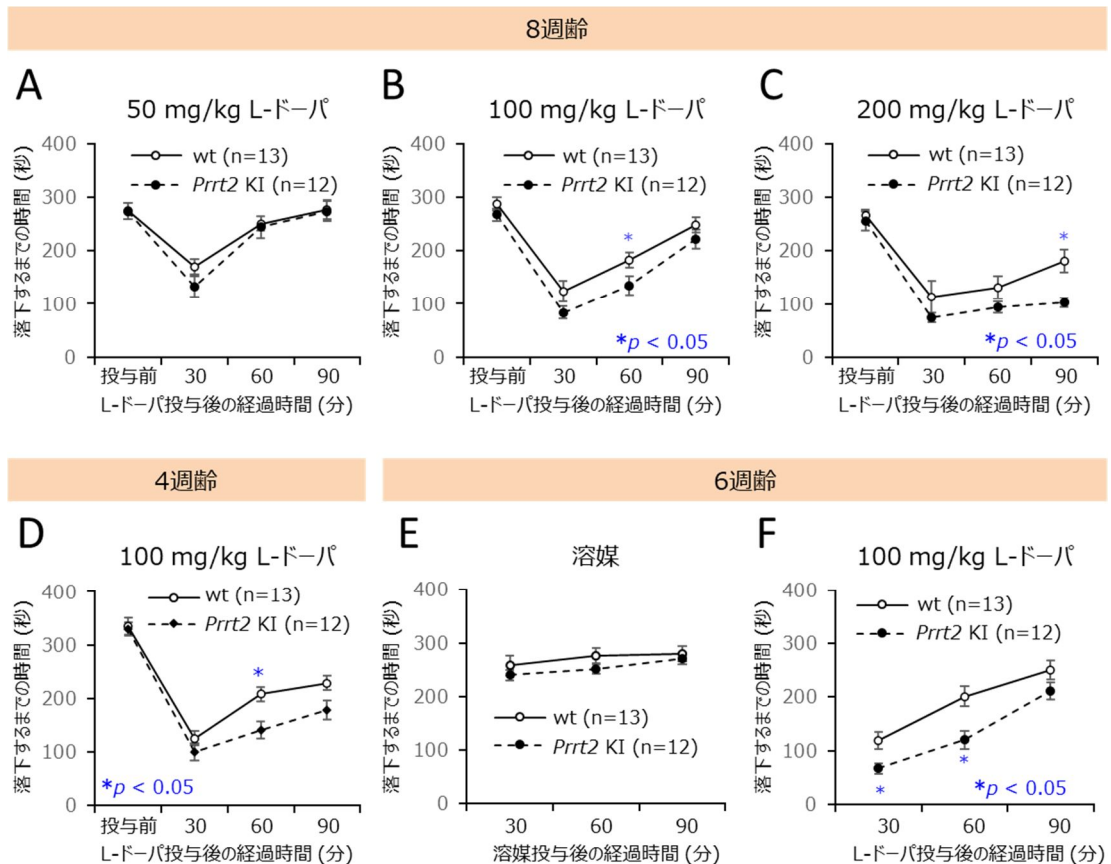


図 4 L-ドーパ投与時の運動能力

(A-C) 8 週齢の野生型 (n=13) または *Prrt2* KI (n=12) マウスにおいて 25 mg/kg カルビドーパ及び 50 mg/kg (A)、100 mg/kg (B)、または 200 mg/kg (C) の L-ドーパを投与し、投与前及び投与後 30、60 及び 90 分においてロータロッド試験を行なった。(D) 4 週齢の野生型 (n=13) または *Prrt2* KI (n=12) マウスにおいて 25 mg/kg カルビドーパと 100 mg/kg L-ドーパを投与し、同様の試験を行なった。(E) 6 週齢の野生型 (n=13) または *Prrt2* KI (n=12) マウスにおいて生理食塩水及び 0.04 N HCl 生理食塩水を投与し、30、60 及び 90 分後にロータロッド試験を行なった。(F) 溶媒投与の翌日に同マウスに 25 mg/kg カルビドーパ及び 100 mg/kg L-ドーパを投与し、同様の試験を行なった。エラーバーは標準誤差を示す。

* $p < 0.05$ (wt vs. *Prrt2* KI)

以上のように、本研究ではL-ドーパにより *Prmt2* KI マウスの運動誘発性の運動障害のフェノタイプを誘発することに成功し、本マウスを PKD モデル動物として確立した。また同時に、*Prmt2* 変異による線条体での過剰なドーパミン伝達 (図 1、未発表データ) が PKD の発症に寄与することが裏付けられた。先行研究と本研究の成果を総合すると、PKD の責任神経回路は多量のドーパミン作動性神経の投射を受ける線条体を含む大脳皮質-大脳基底核運動回路であり (図 5 左)、線条体での過剰なドーパミン伝達により直接路の活性化と間接路の抑制が起こり、最終的に大脳皮質に過剰な興奮刺激が伝わり、不随意運動を生じると考えられる (図 5 右)。この PKD の発症機序を線条体ドーパミン説と命名し、新たな仮説としてここに提唱する。PKD の新規治療薬としてはドーパミン伝達を調節する薬剤が候補となるため、今後、ドーパミン受容体アンタゴニスト等の薬剤による PKD の治療効果を *Prmt2* KI マウスを用いて検証していく。

また、稀なケースではあるが、PKD 患者がパーキンソン病等に罹患し、L-ドーパによる治療を行う場合には、ジスキネジアの副作用が出やすいことを考慮して用量を調節する必要があると考える。

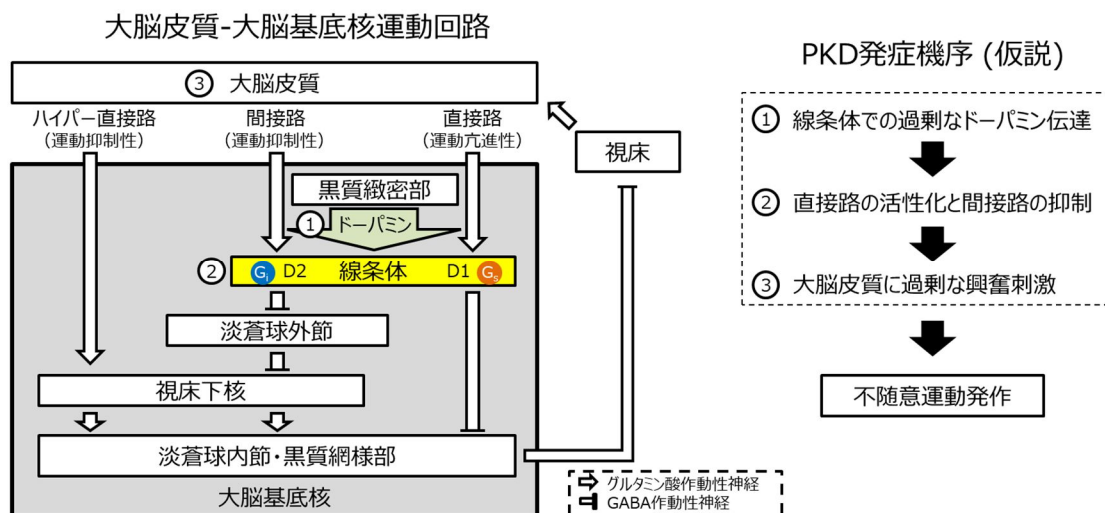


図 5 PKD の責任神経回路と発症機序の仮説

PKD の責任神経回路は大脳皮質-大脳基底核運動回路 (左図) と考えられる。本回路は運動亢進性の直接路と運動抑制性の間接路、ハイパー直接路で構成されており、黒質緻密部から線条体へ投射するドーパミン作動性神経により直接路と間接路が調節を受ける (左図)。PKD では *PRRT2* の機能消失により神経興奮時に線条体で過剰なドーパミン伝達が起こり、直接路の活性化と間接路の抑制を介して大脳皮質が過剰興奮する結果、不随意運動発作を生じるという仮説を立てた (右図)。右図と左図の番号、及びはそれぞれ対応している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八田 大典、光成 晃輝、永田 健太郎、金本 海斗、濱田 麻希、西村 聖未、淵上 由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦 孝一郎、黒滝 直弘、城谷 圭朗、岩田 修永
2. 発表標題 マウス線条体におけるジスキネジア関連分子PRRT2のドーパミン神経伝達における役割
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------